

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/085399 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/00, 45/00, 46/00, 47/00, 48/00, 49/00, 50/00, 51/00, 52/00, 53/00, 54/00, 55/00, 56/00, 57/00, 58/00, 59/00, 60/00, 61/00, 62/00, 63/00, 64/00, 65/00, 66/00, 67/00, 68/00, 69/00, 70/00, 71/00, 72/00, 73/00, 74/00, 75/00, 76/00, 77/00, 78/00, 79/00, 80/00, 81/00, 82/00, 83/00, 84/00, 85/00, 86/00, 87/00, 88/00, 89/00, 90/00, 91/00, 92/00, 93/00, 94/00, 95/00, 96/00, 97/00, 98/00, 99/00
A61P 35/00, 15/00, 43/00 (JP). 山田 隆央 (YAMADA, Takao) [JP/JP]; 〒580-0003 大阪府 松原市 一津屋 4 丁目 3 番 2 6 号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03898 (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 4 月 19 日 (19.04.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-123299 2001 年 4 月 20 日 (20.04.2001) JP (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP). 大町 佳宏 (OMACHI, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒532-0023 大阪府 大阪市 淀川区十三東5丁目4番14号 ヴァンヴェール淀川 206号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高田 重行 (TAKADA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒662-0052 兵庫県 西宮市 銭町3番20-504号 Hyogo (JP). 大瀬 徹也 (OHTAKI, Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ802号 Ibaraki
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PEPTIDE-CONTAINING PREPARATIONS

(54) 発明の名称: ペプチド含有製剤

(57) Abstract: Metastatin-containing preparations which have an activity of inhibiting cancer metastasis, are useful in treating or preventing any cancers, have an effect of controlling placental functions, are useful in treating or preventing villous cancer, hydatid mole, invasive mole, abortion, fetal hypoplasia, sugar metabolic error or abnormalities in delivery, can exert the drug effect only in a small dose, can relieve side effects, are not necessarily administered everyday, and can relieve inconvenience and pain of patients. Sustained-release preparations which are useful in treating or preventing any diseases caused by disorders in physiological activity of metastatin. Because of having an activity of inhibiting cancer metastasis, these preparations are particularly useful in treating or preventing any cancers. Because of having an effect of controlling placental functions, these preparations are useful in treating or preventing villous cancer, hydatid mole, invasive mole, abortion, fetal hypoplasia, sugar metabolic error, lipid metabolic error or abnormalities in delivery. Because of having an effect of controlling pancreatic functions, the preparations are also useful in treating or preventing pancreatic diseases.

[続葉有]

WO 02/085399 A1



(57) 要約:

本発明は、癌転移抑制活性を有し、あらゆる癌の治療または予防に有用であり、胎盤機能調節作用を有し、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の治療または予防に有用であり、薬効を得るための高投与量が不要であり、副作用の軽減が達成でき、連日投与が不要であり、患者の不便性や苦痛も軽減されるメタスチン含有製剤を提供する。

本発明の徐放性製剤は、メタスチンの生理活性障害を原因とする全ての疾患の治療または予防に有用である。特に、本発明の製剤は癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌の治療または予防に有用である。また、本発明の製剤は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の治療または予防に有用である。更に、本発明の製剤は、膵臓機能調節作用を有するため、膵臓疾患の治療または予防にも有用である。

明細書

ペプチド含有製剤

技術分野

- 5 本発明は、メタスチン (metastin) [KiSS-1遺伝子にコードされるペプチド：以下、KiSS-1ペプチドと称することがある] もしくはその誘導体またはその塩を含有する製剤に関する。

背景技術

- 10 KiSS-1ペプチドは、ガン転移抑制遺伝子KiSS-1 (Genomics、54巻、145頁-148頁、1998年) にコードされるタンパク質のC端部分ペプチドである。KiSS-1遺伝子は、ヒト6番染色体をC8161メラノーマに移入すると転移能が低下することから、6番染色体を移入して得た低転移株と親株からサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (Subtractive Hybridization Technique) により取得され、KiSS-1遺伝子
- 15 子をC8161メラノーマにトランスフェクションするとその発現量に応じて転移能が低下することが見出されている (J. Natl. Cancer Inst.、88巻、1731頁-1737頁、1996年)。また、KiSS-1遺伝子のトランスフェクションによりヒト乳ガン細胞MDA-MB-435の転移能も低下することが報告されている (Cancer Research、57巻、2384頁-2387頁、1997年)。
- 20 KiSS-1遺伝子産物から切り出されて生成するペプチド、メタスチンには、その遺伝子がガン転移抑制遺伝子であることから、ガン転移抑制活性を有することが期待される。メタスチンはin vitroでは、メタスチンのヒト型受容体であるhOT7T175を発現させたCHO細胞の走化性と浸潤を阻害し、in vivoではhOT7T175を発現させたB16-BL6悪性黒色細胞腫の肺への転移性を弱める (Nature、411巻、613頁、2001
- 25 年等)。さらに、本遺伝子が胎盤に多量に発現されていること (J. Natl. Cancer Inst.、88巻、1731頁-1737頁、1996年) や該ペプチドのヒト型受容体であるhOT7T175が、胎盤に多量に、脾臓にも比較的高く発現 (例、Nature 411巻、613頁-617頁、2001年等) していることより、該ペプチドが胎盤で重要な機能を担っている、

または脾臓においても本ペプチドは何らかの生理機能を発揮しているものと期待される。

生理活性ポリペプチドは一般的に生体内での半減期が短いために、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩についても、充分な薬理効果を得るためには高投与
5 量で長期間投与することが必要となる。しかしながら、例えばメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液を皮下投与する場合には、副作用の発現や、治療又は予防のための実際の投与において患者の不便性や苦痛が懸念される。従って、これらの問題を解決できるメタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する有用な製剤の開発が望まれている。

10

発明の開示

本発明者らは、上記の課題に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、メタスチン、その誘導体またはその塩を徐放性製剤として投与すると、高転移性ガン細胞に作用して転移を抑制するほか、長期間にわたりメタスチンもしくはその誘導体またはその塩が
15 徐放され、したがって薬効を得るために高投与量を必要としないので、副作用の軽減が達成でき、かつ連日投与することがないため患者の不便性や苦痛も軽減される等の臨床上の医薬として優れた性質を本発明の製剤が有していることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、

- 20 (1) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する徐放性製剤、
(2) メタスチンを含有する上記(1)記載の徐放性製剤、
(3) メタスチンまたはその誘導体が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から47ないし54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8ないし54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体である上記(1)記載の徐放性製
25 剤、
(4) ペプチドが、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列におけるN末端から47ないし54番目のアミノ酸配列をC末端に有するペプチドである上記(3)記載の徐放性製剤、

- (5) ペプチドが、8ないし15個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記(3)または(4)記載の徐放性製剤、
- (6) ペプチドが、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：5で表わされるアミノ酸配列からなるペプチドである上記(3)記載の徐放性製剤
- 5 。
- (7) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩及びキャリアーを含有する上記(1)記載の徐放性製剤、
- (8) キャリアーがポリマーである上記(7)記載の徐放性製剤、
- (9) ポリマーが生体内分解性ポリマーである上記(8)記載の徐放性製剤、
- 10 (10) 生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである上記(9)記載の徐放性製剤、
- (11) 脂肪族ポリエステルが乳酸／グリコール酸重合体である上記(10)記載の徐放性製剤、
- (12) 乳酸／グリコール酸重合体の乳酸／グリコール酸組成比が約100／0ないし約40／60である上記(11)記載の徐放性製剤、
- 15 (13) 乳酸／グリコール酸重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約80,000である上記(11)記載の徐放性製剤、
- (14) ポリマーが生体内非分解性ポリマーである上記(8)記載の徐放性製剤、
- (15) 生体内非分解性ポリマーがポリグリセリン脂肪酸エステルである上記(14)記載の徐放性製剤、
- 20 (16) 癌の治療又は予防剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- (17) 胎盤機能改善剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- (18) 非経口投与剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- (19) 皮下投与剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- 25 (20) 筋肉内投与剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- (21) 腹腔内投与剤である上記(1)記載の徐放性製剤、
- (22) 徐放性製剤を製造するためのメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用、

(23) 哺乳動物に対して上記(1)記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする癌の治療又は予防方法等に関する。

さらに本発明は、

(24) ペプチドが、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から47ないし54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、かつ8ないし54個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記(4)記載の徐放性製剤、

(25) ペプチドが、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである上記(3)記載の徐放性製剤、

10 (26) マイクロカプセル剤である上記(1)記載の徐放性製剤、

(27) 経口投与剤である上記(1)記載の徐放性製剤、

(28) 注射剤または点滴剤である上記(1)記載の徐放性製剤、

(29) キャリアーがタンパク質、ポリサッカライド、リポソーム及び／又は無機物である上記(7)記載の徐放性製剤、

15 (30) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量が、キャリアーに対して約0.01ないし約50% (w/w) である上記(7)記載の徐放性製剤、

(31) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量が、キャリアーに対して約0.1ないし約50% (w/w) である上記(7)記載の徐放性製剤、

(32) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量が、キャリアーに対して約0.1ないし約30% (w/w) である上記(7)記載の徐放性製剤、

20 (33) 乳酸／グリコール酸重合体の乳酸／グリコール酸組成比が約100/0ないし約50/50である上記(11)記載の徐放性製剤、

(34) 乳酸／グリコール酸重合体の乳酸／グリコール酸組成比が約75/25ないし約50/50である上記(11)記載の徐放性製剤、

25 (35) 乳酸／グリコール酸重合体の重量平均分子量が約5,000ないし約25,000である上記(11)記載の徐放性製剤、

(36) 乳酸／グリコール酸重合体の重量平均分子量が約7,000ないし約20,000である上記(11)記載の徐放性製剤、

(37) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量が、乳酸／グリコール酸重合体に対して約0.1ないし約50% (w/w) である上記(11)記載の徐放性製剤、

(38) さらに多価金属化合物を含有する上記(11)記載の徐放性製剤、

5 (39) 多価金属化合物が酸化亜鉛である上記(38)記載の徐放性製剤、

(40) 酸化亜鉛の使用量が、乳酸／グリコール酸重合体100重量部に対して約0.01ないし約100重量部である上記(39)記載の徐放性製剤、

(41) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩、及びその他の任意の医薬活性物質を含有する上記(1)記載の徐放性製剤、

10 (42) その他の任意の医薬活性物質が抗癌剤である上記(41)記載の徐放性製剤、

(43) 哺乳動物に対して上記(1)記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする癌の転移を抑制する方法、

(44) 哺乳動物に対して上記(1)記載の徐放性製剤の有効量を投与することを
15 特徴とする胎盤機能不全が関与する疾患の治療又は予防方法、

(45) 哺乳動物に対して上記(1)記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする脾臓機能不全が関与する疾患の治療又は予防方法、

(46) 任意の医薬を併用する、上記(43)～(45)のいずれかに記載の治療又は予防方法等も提供する。

20

図面の簡単な説明

図1は、ラットにおける徐放性メタスチン(1-54)含有マイクロカプセルの皮下投与後の血中メタスチン(1-54)濃度(pmol/ml)の経時変化を示すグラフである。

25

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる「メタスチン」は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から1番目ないし54番目のアミノ酸の連続した54個全てのアミ

ノ酸残基を有し、かつC末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) であるペプチドを意味する。

本発明で用いられる「メタスチンの誘導体」は、メタスチンの生理活性（例えば、メタスチンとその受容体（例えば、W000/24890などに記載のh0T7T175など）の結合活性、メタスチンによって引き起こされる受容体発現細胞の細胞刺激活性など）と実質的に同等の活性を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から47番目ないし54番目の連続した8個全てのアミノ酸残基（配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列）を含有するペプチドまたはその誘導体を意味する。そのC末端は、アミド ($-\text{CONH}_2$) であってもよく、また、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート基 (COO^-) 及びエステル ($-\text{COOR}$) の何れであってもよいが、C末端のカルボキシル基がアミド化されたアミド体であることが好ましい。また、メタスチンの誘導体は、メタスチンの生理活性と実質的に同等の活性を有し、かつ、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列（8個の必須アミノ酸残基）を有するものであれば、その長さは特に限定されないが、8ないし54個のアミノ酸残基（好ましくは、8ないし15個のアミノ酸残基）からなるペプチドもしくはその誘導体が好ましく用いられる。すなわち、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8ないし54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体が好ましく、なかでも、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8ないし15個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体が好ましい。

また、前記したメタスチンの誘導体において、8個の必須アミノ酸残基（配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列）の配置は、該メタスチンの誘導体がメタスチンの生理活性と実質的に同等の活性を有するのであれば、何れの部位に配置されていてもよいが、該8個の必須アミノ酸残基はC末端に配置されるのが望ましい。すなわち、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列を

C末端に有し、8ないし54個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体が好ましく、なかでも、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8ないし15個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体が好ましい。

- 5 本発明で用いられる「ペプチドの誘導体」は、特定のアミノ酸配列で示されるペプチドのC末端が、アミド ($-\text{CONH}_2$)、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート基 (COO^-) 及びエステル ($-\text{COOR}$) の何れかに変換されたものを包含する。例えば、特定のアミノ酸配列で示されるペプチドのC末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) である場合には、ペプチドの誘導体とは、C末端がカルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート基 (COO^-) 及びエステル ($-\text{COOR}$) の何れかに変換されたカルボキシル体、カルボキシレート体及びエステル体をそれぞれ包含し、特定のアミノ酸配列で示されるペプチドのC末端がカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) である場合には、ペプチドの誘導体とは、C末端が、アミド ($-\text{CONH}_2$)、カルボキシレート基 (COO^-) 及びエステル ($-\text{COOR}$) の何れかに変換されたアミド体、カルボキシレート体及びエステル体をそれぞれ包含する。
- 10 15 ペプチドもしくはその誘導体としては、例えばC末端がアミド ($-\text{CONH}_2$) であるアミド体が好ましく用いられる。

- 上記メタスチンもしくはその誘導体は、例えば発酵生産物、合成化合物、合成ペプチドなどの何れであってもよく、また、天然由来のものでもよく、遺伝子工学的
- 20 手法によって製造された組み換え型ペプチドでもよい。

- 天然由来のメタスチンもしくはその誘導体としては、例えばヒト、サル、マントヒヒ、チンパンジー、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウス、ラットなどのあらゆる哺乳動物由来のメタスチンもしくはその誘導体が用いられ、中でもヒト由来のものが好ましい。本発明の製剤をヒトに適用する場合は、とりわけヒト由来のメタスチン
- 25 ンもしくはその誘導体を用いるのが好ましい。

本発明に用いられるメタスチンもしくはその誘導体として好ましくは、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から47ないし54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、かつ8ないし15個のアミノ酸配列からなるペプチ

ドなどがあげられる。

さらに好ましくは、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（特にこれらのアミド体）などがあげられる。あるいは、WO 01/75104に記載の配列番号：1、配列番号
5 : 2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するマウスまたはラット由来のペプチド（Kiss-1遺伝子産物）を用いてもよい。

また、メタスチンもしくはその誘導体のC末端は通常アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）であるが、エステル（ $-\text{COOR}$ ）あるいはカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート基（ COO^- ）であってもよい。中でもC末端のカルボキシル基が
10 アミド化されたアミド体であるものが特に好ましい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-
15 C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基などのほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

さらに、本発明で用いられるメタスチンもしくはその誘導体には、メチオニン残基などのN末端のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6}
20 アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護され
25 ているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。糖タンパク質である場合、糖鎖としては、例えばD-マンノース、D-ガラクトース、L-フルクトース等の中性糖、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン等のアミノ糖、及びシアル酸等が挙げられる。

メタスチンもしくはその誘導体は塩を形成していてもよく、メタスチンもしくはその誘導体の塩としては、とりわけ薬理学的に許容される塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば塩酸、りん酸、臭化水素酸、硫酸等）との塩、有機酸（例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸等）との塩、無機塩基との塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、アンモニウム塩等）、有機塩基との塩（例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N，N-ジベンジルエチレンジアミン等）等が用いられる。

本発明に用いられるメタスチンもしくはその誘導体は、公知の方法（例えば、W O 00/24890, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1巻, 1748頁, 2001年）等に記載の方法など）あるいはそれに準じる方法に従って製造することができ、例えば公知のペプチドの合成法に従って、あるいは公知のペプチド又は前駆体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成方法は、例えば固相合成法、液相合成法の何れでもよい。即ち、目的とするペプチドは、そのペプチド又は前駆体を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば以下の[1]ないし[5]に記載された方法が挙げられる。

- [1] M. Bodanszky 及び M. A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- [2] Schroeder 及び Luebke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- [3] 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）(1975年)
- [4] 矢島治明及び榊原俊平、生化学実験講座1、ペプチド又は前駆体の化学IV、205、(1977年)

[5] 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて目的とするペプチド又は前駆体を精製単離することができる。上記方法で得られるペプチド又は前駆体は遊離
5 体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のメタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する徐放性製剤は、キャリアー（担体または基剤）を含有しているのが好ましい。キャリアーとしては、例えば、タンパク質、ポリサッカライド、ポリマー（生体内分解性ポリマー、生
10 体内非分解性ポリマー）、リポソーム、無機物等が挙げられる。

タンパク質としては、例えばコラーゲン、ゼラチン、フィブリン、血清アルブミン等が挙げられる。

ポリサッカライドとしては、例えばデンプン、ヒアルロン酸、キトサン、キチン、アルギン酸塩、アガロース、デキストラン、セルロース誘導体等が挙げられる。

15 生体内分解性ポリマーとしては、例えば脂肪族ポリエステル、ポリフォスファゼン、ポリオルソエステル等が挙げられる。

生体内非分解性ポリマーとしては、例えばポリグリセリン脂肪酸エステル、シリコン、エチルビニルアセテート共重合体、ポリヒドロキシエチルメチルメタアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

20 リポソームとしては、通常のリポソームに加えて例えばポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソーム、糖修飾リポソーム等が挙げられる。

無機物としては、例えばハイドロキシアパタイト、トリカルシウムフォスフェイト、カルシウムカルボネート、カルシウムサルフェイト等が挙げられる。

本発明の徐放性製剤に用いるキャリアーとしては、例えばポリマー（例えば生体内分解性ポリマー、生体内非分解性ポリマー等）等が好ましく、特に生体内分解性
25 ポリマーとしては、例えば脂肪族ポリエステル等、生体内非分解性ポリマーとしては、例えばポリグリセリン脂肪酸エステル等が好ましい。

脂肪族ポリエステルとしては、例えば乳酸／グリコール酸重合体等が用いられる

。 乳酸／グリコール酸重合体の組成比（乳酸／グリコール酸；L／G比）（モル％）は約100／0ないし約40／60が好ましく、更に好ましくは約100／0ないし約50／50であり、特に好ましくは約75／25ないし約50／50である

5 。

乳酸／グリコール酸重合体の重量平均分子量は約3,000ないし約80,000が好ましく、更に好ましくは約5,000ないし約25,000であり、特に好ましくは約7,000ないし約20,000である。

10 乳酸／グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量／数平均分子量）は、好ましくは約1.2ないし約4.0、更に好ましくは約1.5ないし約3.5である。

ポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばテトラグリセロールモノパルミテート（TGMP）、テトラグリセロールジパルミテート（TGDP）、テトラグリセロールトリパルミテート（TGTP）、テトラグリセロールヘキサパルミテート（TGHP）、テトラグリセロールモノステアレート（TGMS）、テトラグリセロールジステアレート（TGDS）、テトラグリセロールトリステアレート（TGTS）、テトラグリセロールヘキサステアレート（TGHS）、ヘキサグリセロールペンタステアレート（HGPS）、テトラグリセロールヘキサパルミテート（TGHP）等が挙げられ、これらを単独であるいは混合して用いることができる。

本発明の徐放性製剤は、公知の方法にしたがって製造される。

20 本発明の徐放性製剤は、具体的には、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩と、徐放性製剤の製造時に通常用いられるキャリアー（例えば前記キャリアー）とを混合し、必要に応じて成形することによって製造される。該キャリアーは、例えばメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量が、キャリアーに対して約0.01ないし約50％（w/w）、好ましくは約0.1ないし約30％（w/w）となるように使用される。

25

以下に本発明の徐放性製剤として、例えば（A）生体内非分解性ポリマーであるポリグリセリン脂肪酸エステルをキャリアーとして用いた「メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する徐放性製剤」〔以下、KiSS-1ペプチド含有徐放性

製剤と称することがある]、及び(B)生体内分解性ポリマーである乳酸／グリコール酸重合体をキャリアーとして用いたKiSS-1ペプチド含有徐放性製剤の製造法について例示する。

5 (A) ポリグリセリン脂肪酸エステルをキャリアーとして用いたKiSS-1ペプチド含有徐放性製剤

ポリグリセリン脂肪酸エステルを加温・融解し、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の粉末を添加し、攪拌等により均等に分散させる。その後冷却し、円盤状、フィルム状、棒状等に成形する。このようにして所定量のメタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有するポリグリセリン脂肪酸エステルの徐放性製剤を得ることができる。加温温度は約50ないし約100℃、冷却温度は約0ないし約40℃である。メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異なるが、ポリグリセリン脂肪酸エステルに対して約0.01ないし約50% (w/w)、好ましくは約0.1ないし約30% (w/w) である。

15 (B) 乳酸／グリコール酸重合体をキャリアーとして用いたKiSS-1ペプチド含有徐放性製剤

(B-1) 棒状成形物等の製造法について詳述する。

(B-1-a)

乳酸／グリコール酸重合体を有機溶媒（好ましくはジクロルメタン等）で溶解し、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液を添加後乳化する。これを真空乾燥し、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩が均等に分散した乳酸／グリコール酸重合体の粉末を得る。これを加温し、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形する。このようにして所定量のメタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する乳酸／グリコール酸重合体の徐放性製剤を得ることができる。加温温度は約50ないし約100℃、冷却温度は約0ないし約40℃である。メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異なるが、乳酸／グリコール酸重合体に対して約0.01ないし約5

0 % (w/w)、好ましくは約 0.1 ないし約 30 % (w/w)、特に好ましくは約 1 ないし約 20 % (w/w) である。

(B-1-b)

- 乳酸／グリコール酸重合体を有機溶媒（好ましくはジクロルメタン等）で溶解し、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の粉末を添加後、均一に分散させる。得られる分散系を真空乾燥し、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩が均等に分散した乳酸／グリコール酸重合体の粉末を得る。これを加温し、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形する。このようにして所定量のメタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する乳酸／グリコール酸重合体の徐放性製剤を得ることができる。加温温度、冷却温度、およびメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量は、前記と同様である。

(B-2) マイクロカプセル（マイクロスフェアとも称する）の製造法について詳述する。

- W/O/Wエマルジョン及びO/Wエマルジョンは、それぞれ (i) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液、分散液又は懸濁液を内水相とし、乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を油相とするW/Oエマルジョンを得るか、又は (ii) メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して油相を得、この (i) 又は (ii) を水（外水相）に添加し、分散、乳化することによって製造される。

- 上記 (i)、即ち、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液、分散液又は懸濁液を内水相とし、乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を油相とするW/Oエマルジョンは、以下のようにして製造される。

- まず、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を水に溶解、分散又は懸濁し、内水相を製造する。メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液、分散液又は懸濁液中の濃度は、例えば 0.001 ないし 90 % (w/w)、好ましくは 0.01 ないし 80 % (w/w) である。

上記メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異

なるが、乳酸／グリコール酸重合体に対して、約0.01ないし約50% (w/w)、好ましくは約0.1ないし約30% (w/w)、特に好ましくは約1ないし約20% (w/w) である。

必要であれば、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩のマイクロカプセル
5 への取り込みを上げるために、内水相にゼラチン、寒天、アルギン酸ナトリウム、
ポリビニルアルコールあるいは塩基性アミノ酸（例えばアルギニン、ヒスチジン、
リジン等）等の薬物保持物質（例えば、賦形剤、助剤など）を加えてもよい。該薬
物保持物質の添加量は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩に対し、通常
約0.01ないし約10重量倍である。

10 内水相は、一旦凍結乾燥して粉末状態とした後、適当な濃度となるように水を添
加して溶解して用いてもよい。

別に、乳酸／グリコール酸重合体を有機溶媒に溶解し、油相を製造する。

前記有機溶媒としては、ハロゲン化炭化水素（例えばジクロロメタン、クロロホルム、
クロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素等）、脂肪酸エステル（例え
15 ば酢酸エチル、酢酸ブチル等）、芳香族炭化水素（例えばベンゼン、トルエン、キ
シレン等）が挙げられ、中でもジクロロメタンが好ましい。

有機溶媒中の乳酸／グリコール酸重合体の濃度は、該乳酸／グリコール酸重合体
の種類、分子量、有機溶媒の種類により異なるが、 $\left[\frac{\text{乳酸／グリコール酸重合体の重量}}{\text{有機溶媒の重量} + \text{乳酸／グリコール酸重合体の重量}} \right] (\times 100\%)$ は
20 、通常約0.01ないし約90% (w/w)、好ましくは約0.01ないし約70%
(w/w) である。未溶解物がないように溶解するのがよい。

このようにして得られる乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液（油相）に、
上記したメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の水溶液、分散液又は懸濁液
（内水相）を添加し、ホモミキサー等で分散、乳化し、W/Oエマルションを製造
25 する。

一方、上記(ii)、即ち、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を乳酸／
グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して得られる油相は、以下
のようにして製造される。

まず、乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を製造する。該有機溶媒としては、上記W／Oエマルジョンを製造する際に用いた有機溶媒と同様のものが用いられる。

有機溶媒溶液中の乳酸／グリコール酸重合体の濃度は、該乳酸／グリコール酸重合体の分子量、有機溶媒の種類によって異なるが、
5 重量／（有機溶媒の重量＋乳酸／グリコール酸重合体の重量） $\times 100\%$ は、通常約0.01ないし約70%（w／w）、好ましくは約1ないし約60%（w／w）である。

次に、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を乳酸／グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して油相を製造する。
10

メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用量は、該メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の乳酸／グリコール酸重合体に対する割合が上記W／Oエマルジョン（i）を製造する場合と同様になるように選択すればよい。

ついで上記した（i）W／Oエマルジョン又は（ii）油相を、外水相に添加し、
15 ホモミキサー等を用いて分散、乳化し、それぞれW／O／Wエマルジョン又はO／Wエマルジョンを製造する。

外水相の使用量は、通常上記（i）又は（ii）の約1ないし約10,000容量倍、好ましくは約10ないし約5,000容量倍、特に好ましくは約50ないし約1,000容量倍である。

外水相中には、通常乳化剤を添加する。該乳化剤としては、一般的に安定なW／O／Wエマルジョン又はO／Wエマルジョンを形成し得るものであればよく、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられるが、中でもポリビニルアルコールが好ましい。
25 外水相中の乳化剤の濃度は、通常約0.001ないし約20%（w／w）、好ましくは約0.01ないし約10%（w／w）、特に好ましくは約0.05ないし約5%（w／w）である。

このようにして得られるW／O／Wエマルジョン又はO／Wエマルジョン（以下

、これらを単にエマルションと略記する場合がある)を水中乾燥法に付すことにより、これらエマルションに含まれる有機溶媒を除去してマイクロカプセルを製造することができる。

- 5 このようにして得られるマイクロカプセルは、遠心分離あるいは篩等で回収し、
所望により、マイクロカプセル同士の凝集を防止するため糖あるいは糖アルコール、無機塩等、好ましくはマンニトール、ソルビトール等の凝集防止剤を添加した後、凍結乾燥に付す。

- 10 マイクロカプセルと凝集防止剤の混合割合(重量比)は、約50:1ないし約1:1、好ましくは約20:1ないし約1:1、更に好ましくは約10:1ないし約5:1である。

凝集防止剤の添加方法は、マイクロカプセルと凝集防止剤とが均一に混合される方法であれば特に限定されないが、例えば凝集防止剤の水溶液にマイクロカプセルを分散する方法等が挙げられる。

- 15 メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の徐放性マイクロカプセルの製造法においては、水中乾燥法によりマイクロカプセル化するのが好適である場合が多い。

このようにして得られたマイクロカプセルは、必要があれば減圧下加温乾燥しマイクロカプセル中の水分及び溶媒の除去をより完全に行う。

- 20 また、前記したW/O/Wエマルション又はO/Wエマルションを用いる方法の他に、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の粉末(S相)を、乳酸/グリコール酸重合体を溶解した有機溶媒液(O相)に分散させた、S/O型分散液から溶媒を除去することによる方法(例えばS/O/W法など)により製造することもできる。

- 25 本法は、まず乳酸/グリコール酸重合体を有機溶媒に溶解し、この有機溶媒液中にメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の粉末(S相)を添加し分散させる。この際、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩と乳酸/グリコール酸重合体との混合割合(重量比)は、例えば約1:10, 000ないし約1:1、好ましくは約1:1, 000ないし約2:5、更に好ましくは約1:100ないし約1:

3である。また、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩の粉末を有機溶媒液中に均一に分散させるため、外部物理的エネルギーを加えることが好ましい。その方法としては例えば超音波照射、タービン型攪拌器、ホモジナイザー等が用いられる。

- 5 次いでこのようにして調製された有機溶媒分散液（S/O型分散液）を、更に水性溶媒（W相）中に添加して、上記と同様の外部物理的エネルギー、例えば超音波照射、タービン型攪拌器、あるいはホモジナイザー等によりS/O/W型エマルションを形成させる。以後、油相溶媒を蒸発させマイクロカプセルを製造する。この際の水相体積は、一般的には油相体積の約1倍ないし約10,000倍から選ばれ
- 10 る。更に好ましくは約10倍ないし約5,000倍、特に好ましくは約50倍ないし約1,000倍から選ばれる。

- 上記外水相中には、乳化剤を加えてもよい。該乳化剤としては、一般的に安定なS/O/Wエマルションを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマ
- 15 シ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられる。これらは適宜組み合わせ使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約0.001%ないし約20%（w/w）である。更に好ましくは約0.01%ないし約10%（w/w）、特に好ましくは約0.05%ないし約5%（w/w）である。

- 20 このようにして得られたマイクロカプセルは、遠心分離あるいは濾過操作により分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している乳化剤等を蒸留水による洗浄で除去し、再び蒸留水等に分散して凍結乾燥する。その後必要であれば、加温してマイクロカプセル中の水分及び有機溶媒を更に除去する。減圧下に加温してもよい。加温条件としては、用いた乳酸／グリコール酸重合体のガラス転移温度以上で、
- 25 マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。好ましくは、乳酸／グリコール酸重合体のガラス転移温度からガラス転移温度より約30℃高い温度の範囲で加熱乾燥する。ここでガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分10ないし20℃で昇温した際に得られる中間点を云う。

このようにして得られるマイクロカプセルは、粒子同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類（例えばコーンスターチ等）、ヒアルロン酸あるいはこのアルカリ金属塩等の水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等のタンパク質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類等が適宜用いられる。

また、マイクロカプセルは、前記（B-1-a）の場合と同様に、加温後、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形することもできる。

前記した各種製造法において、有機溶媒に乳酸／グリコール酸重合体を溶解する際に、該有機溶媒に酸化亜鉛などの多価金属化合物を添加してもよい。

酸化亜鉛の使用量は、乳酸／グリコール酸重合体100重量部に対し、例えば約0.01ないし約100重量部、好ましくは約0.1ないし約20重量部である。

また、酸化亜鉛の粒子径は、通常約0.001ないし約10 μ m、好ましくは約0.005ないし約1 μ mである。

このように、酸化亜鉛などの多価金属化合物を使用して得られる徐放性製剤は、「薬物取り込み率が高い」、「長期にわたって持続的に薬物を放出できる」等の優れた性質を有する。

本発明の徐放性製剤を製造する際に、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を、揮発性の塩類例えば酢酸アンモニウムの水溶液に溶解し、凍結乾燥して用いてもよい。

このように酢酸アンモニウムで処理して得られるメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の凍結乾燥品は、粒子径が小さく、優れた操作性を有するので、徐放性製剤を製造する際に有利である。

こうして得られる本発明の徐放性製剤は、そのままあるいは所望により製剤学的に許容される添加剤（例えば、安定化剤、保存剤、無痛化剤等）を用いて種々の剤形に製造して投与することができる。このような製剤としては、例えば非経口剤（例えば注射剤、埋め込み剤、坐剤等）、経口剤（例えばカプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等）等が挙げられる。製

剤学的に許容される添加剤としての安定剤としては、例えばヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等、保存剤としては、例えばベンジルアルコール、フェノール等、無痛化剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等が挙げられる。本発明の製剤におけるメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の含有量は、製剤全体に対して通常約0.01ないし約100% (w/w) の範囲から適宜選択することができる。

本発明の徐放性製剤は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を、水性溶剤（例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）または油性溶剤（例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、コーン油等の植物油；プロピレングリコール等）に溶解、懸濁または乳化した後、市販の徐放性製剤用容器〔例、デュロス（商品名、アルザ社製）〕に封入することによっても製造される。

本発明の徐放性製剤は、例えばマイクロカプセルとして、あるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化してなる製剤として、非経口剤（例、筋肉内、腹腔内、皮下、臓器等への注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮等への経粘膜剤等）、経口剤（例、カプセル剤（例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等）、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤等）等として投与することができる。

本発明の製剤は特に注射用であることが好ましい。例えば、徐放性製剤がマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルを分散剤（例、Tween80、HCO-60等の界面活性剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸等の多糖類等）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベン等）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖等）等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な徐放性注射剤が得られる。また、ゴマ油、コーン油等の植物油あるいはこれにレシチン等のリン脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例、ミグリオール812）と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。

徐放性製剤が例えばマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルの粒子径は、懸濁注射剤として使用するためには、その分散度、通針性を満足する範囲であれ

ばよく、例えば平均粒子径として約0.1ないし約300 μm の範囲が挙げられる。平均粒子径は、好ましくは約1ないし約150 μm 、特に好ましくは約2ないし約100 μm の範囲である。

上記のマイクロカプセルを無菌処理するには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法などが挙げられるが、特に限定されない。

本発明の製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えばサル、マントヒヒ、チンパンジー、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、マウス、ラット等）に対して投与することができる。

10 本発明の製剤は、メタスチンの生理活性が関与する全ての疾患の治療または予防に用いることができる。特に、本発明の製剤は、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍等）の治療または予防に有効に用いることができる。さらに、本発明の製剤は、膵臓機能調節作用を有するため、
15 種々の膵臓疾患（例えば、急性または慢性膵炎、膵癌等）の治療または予防にも有効に用いることができる。

また、本発明の製剤は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の治療または予防に有効に用いることができる。

20 本発明の製剤の投与量は、有効成分であるメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の種類と含有量、剤形、放出の持続期間、投与対象、投与ルート、投与目的、対象疾患、症状等に応じて適宜選択することができるが、所望の持続期間中に当該有効成分が医薬上有効な濃度で体内に維持される量であればよい。例えば成人の癌患者（体重約60kg）の治療において、例えば約1ヶ月型徐放性注射剤として
25 投与する場合、1回あたり、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩として例えば約0.1ないし約100mg/kg体重、好ましくは約1ないし50mg/kg体重の範囲の量を用いる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回、1ヵ月に1回、2ヵ月に1回、6ヵ月に1回等、KiSS-1ペプチドの種類と含量、剤形、放出

の持続期間、対象疾病、対象動物等によって適宜選ぶことができる。好ましくは1週間ないし2ヵ月型徐放性製剤、さらに好ましくは1週間ないし1ヵ月型徐放性製剤が挙げられる。

また、本発明の製剤は、メタスチンもしくはその誘導体またはその塩が医薬上有効である種々の疾患のためのその他の医薬、特に癌治療のための化学療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤等の薬剤（以下、併用薬剤と略記する）と組み合わせて用いることができる。この際、本発明の製剤及び併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、临床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、本発明の製剤と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせ等に応じて適宜選択することができる。

化学療法剤としては、例えばアルキル化剤（例えばサイクロフォスファミド、イフォスファミド、ニムスチン、ラニムスチン、カルボコン等）、代謝拮抗剤（例えばメソトレキセート、5-フルオロウラシル、テガフル、カルモフル、UFT、ドキシフルリジン、シタラビン、エノシタビン、メルカプトプリン、メルカプトプリンリボシド、チオグアニン等）、抗癌性抗生物質（例えばマイトマイシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ピラルビシン、イダルビシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、アクチノマイシン等）、植物由来抗癌剤（例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エトポシド、カンプトテシン、イリノテカン等）、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル、エストラムスチン等が挙げられる。

ホルモン療法剤としては、例えば副腎皮質ホルモン薬（例えばプレドニゾロン、プレドニゾン、デキサメタゾン、酢酸コルチゾン等）、エストロゲン薬（例えばエストラジオール、エチニルエストラジオール、ホスフェストロール、クロロトリアニセン等）、抗エストロゲン薬（例えばエピチオスタノール、メピチオスタン、タモキシフェン、クロミフェン等）、黄体ホルモン薬（例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ジドロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、ノルエチステロン、ノルエチンドロン等）、LHRH誘導体（例えば酢酸リユープロレリン等）等が挙

げられる。

免疫療法剤としては、例えば微生物又は細菌成分（例えばムラミルジペプチド誘導体、ピシバニール等）、免疫増強活性のある多糖類（例えばレンチナン、シゾフィラン、クレスチン等）、遺伝子工学的手法で得られるサイトカイン（例えばインターフェロン、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン12（IL-12）、腫瘍壊死因子（TNF）等）、コロニー刺激因子（例えば顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン等）等が挙げられる。

更に、動物モデルや臨床で悪液質改善作用が認められている薬剤、即ち、シクロオキシゲナーゼ阻害剤（例えばインドメタシン等）〔キャンサー・リサーチ（Cancer Research）、第49巻、5935ないし5939頁、1989年〕、プロゲステロン誘導体（例えばメゲステロールアセテート）〔ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー（Journal of Clinical Oncology）、第12巻、213ないし225頁、1994年〕、糖質ステロイド（例えばデキサメサゾン等）、メトクロプラミド系薬剤、テトラヒドロカンナビノール系薬剤（文献は何れも上記と同様）、脂肪代謝改善剤（例えばエイコサペンタエン酸等）〔ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー（British Journal of Cancer）、第68巻、314ないし318頁、1993年〕、成長ホルモン、IGF-1、あるいは悪液質を誘導する因子であるTNF- α 、LIF、IL-6、オンコスタチンMに対する抗体等も本発明製剤と併用することができる。

その他、胎盤や脾臓の疾患の治療又は予防に用いられる一般的な薬剤も併用薬剤として用いられる。その様な薬剤の例としては、臨床上通常用いられる抗炎症剤、解熱鎮痛剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、ホルモン剤等が挙げられる。

以下に、本発明を実施例及び実験例を示して更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明

示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
5	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	Gly	: グリシン
10	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
15	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
20	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
25	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

ヒト由来KiSS-1ペプチドのアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第40番目から第54番目の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

10 配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第45番目から第54番目の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第46番目から第54番目の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

15 配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第47番目から第54番目の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

20 配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

配列番号：3で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：10〕

配列番号：5で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

実施例

実施例 1

- 乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝50／50，ポリスチレン換算平均分子量＝12,000，粘度＝0.145dl/g）1.9gをジクロロメタン3.0mlに溶解した。この有機溶媒液に配列番号：1で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍結乾燥粉末100mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化する。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取する。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプセルを得る。

15 実施例 2

- 乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝50／50，ポリスチレン換算平均分子量＝12,000，粘度＝0.145dl/g）1.89gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン3.0mlに溶解した。この有機溶媒液に配列番号：1で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍結乾燥粉末100mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に25 残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプセルを得た。

実施例 3

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝65／35，粘度＝0.16
0 dl/g）1.69 gと酸化亜鉛10 mgとをジクロロメタン2.7 mlに溶解する。こ
の有機溶媒液に配列番号：1で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1
5 4））の凍結乾燥粉末300 mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用い
て微粒化する。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800 ml
に添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪拌してジクロ
ロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000 rpm）することによりマイクロカプ
セルを分取する。次いで蒸留水400 mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0
10 2 gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥
して徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプセルを得る。

実施例 4

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるヘキサグリセロールペンタステア
レート（HexaGlycerol PentaStearate, HGPS）1560 mgを70℃で加熱融解後、
15 配列番号：1で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍
結乾燥粉末40 mgを添加し、攪拌混合後、内径2.0 mmの移植針に吸引し、室温に
て冷却固化する。固化したメタスチン（1-54）含有HGPSを取り出すため移植針
を66℃で1ないし3分間加熱し押し出し成形する。得られた円柱のペレットを長
さ10 mmに切断し、長径2.0 mm、長さ10 mmの徐放性メタスチン（1-54）含
20 有HGPS製剤を得る。

実施例 5

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝65／35，粘度＝0.16
0 dl/g）1.69 gと酸化亜鉛10 mgとをジクロロメタン2.7 mlに溶解する。こ
25 の有機溶媒液に配列番号：3で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（4
5-54））の凍結乾燥粉末300 mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用
いて微粒化する。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800 m
lに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪拌してジクロ

ロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取する。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（45-54）含有マイクロカプセルを得る。

5

実施例6

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール=65/35、粘度=0.160dl/g）1.69gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン2.7mlに溶解する。この有機溶媒液に250mg/ml濃度の配列番号：3で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（45-54））の水溶液を1.2ml添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化する。このW/O乳化液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取する。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（45-54）含有マイクロカプセルを得る。

。

15

実施例7

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール=65/35、粘度=0.160dl/g）1.69gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン2.7mlに溶解する。この有機溶媒液に配列番号：2で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（40-54））の凍結乾燥粉末300mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化する。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取する。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾

25

燥して徐放性メタスチン（40-54）含有マイクロカプセルを得る。

実施例 8

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝65／35，粘度＝0.16
5 0dl/g）1.69gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン2.7mlに溶解した。こ
の有機溶媒液に250mg/ml濃度の配列番号：2で表されるヒト由来KiSS-1ペプチ
ド（メタスチン（40-54））の水溶液を1.2ml添加し、ポリトロン（キネマ
チカ社）を用いて微粒化する。このW/O乳化液を0.1%ポリビニルアルコール
水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化する。室温で3時間攪
10 拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによ
りマイクロカプセルを分取する。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-
マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥する。更に残留溶媒除去のため、46℃で
3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（40-54）含有マイクロカプセルを得る
。

15

実施例 9

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝50／50，ポリスチレン換
算平均分子量＝12,000，粘度＝0.145dl/g）1.97gと酸化亜鉛10m
gとをジクロロメタン2.7mlに溶解した。この有機溶媒液に配列番号：1で表され
20 るヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍結乾燥粉末20mgを添
加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.
1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・
乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2
, 000rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで蒸留水400m
25 lを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に残留
溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（1-54）含有
マイクロカプセルを得た。

実施例 10

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝50／50，ポリスチレン換算平均分子量＝12,000，粘度＝0.145dl/g）2.148gと酸化亜鉛12mgとをジクロロメタン3.3mlに溶解した。この有機溶媒液に配列番号：1で表
5 されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍結乾燥粉末240mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで蒸留水4
10 00mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.24gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプセルを得た。

実施例 11

15 乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール＝50／50，ポリスチレン換算平均分子量＝12,000，粘度＝0.145dl/g）2.16gをジクロロメタン3.3mlに溶解した。この有機溶媒液に配列番号：1で表されるヒト由来KiSS-1ペプチド（メタスチン（1-54））の凍結乾燥粉末240mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.1%ポリビニル
20 アルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約2,000rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.24gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプ
25 セルを得た。

実験例 1

実施例10で調製した徐放性メタスチン（1-54）含有マイクロカプセルをラ

ット皮下にメタスチン（1-54）量として6mg相当量を投与し、血中メタスチン（1-54）濃度の経時変化を2週間にわたり測定した。結果を図1に示す。

図1で示されるように血中メタスチン（1-54）濃度は2週間にわたり検出された。これより本発明の徐放性製剤が優れた徐放性を有することは明らかである。

5

実験例2

(1) hOT7T175発現B16マウスメラノーマ細胞の作製

hOT7T175のcDNA（WO 00/24890に記載の配列番号：6）を、優性選択マーカーとしてneo^rを有するpAKK0-neo哺乳動物細胞発現プラスミドに定法を用いて連結し、h
10 OT7T175発現コンストラクトを得た。Effectene（QIAGEN社）トランスフェクション試薬を用いて、該hOT7T175発現コンストラクトをB16細胞に導入した。該B16細胞を最終濃度1.2 mg/ml のG418含有RPMI 1640選択培地中で選択培養し、形成されてきたコロニーをクローニングリングを用いて単離し、17クローンのG418耐性B16/h175細胞株を単離した。

15 該遺伝子導入B16/h175細胞株17クローンについて、最終濃度1.2 mg/ml のG418含有RPMI 1640選択培地を用いてT25フラスコ中にて培養し、RNeasy（QIAGEN）を用いて総RNAを抽出した。それぞれのクローンから抽出した1μgのRNAを鋳型として用いて、SuperScript II（Gibco BRL）によってcDNA合成を実施した。hOT7T175に対するTaqManプライマー、TaqManプローブセットを用いてTaqMan PCRを実施し、cl. 4
20 をはじめとする数株の受容体発現株を選別した。

選別した5クローン（cl. 4、cl. 17、cl. 19、cl. 2、cl. 20）について、メタスチンおよびメタスチン（45-54）に対する応答性を、FLIPRを用いた細胞内Ca²⁺濃度変化の検出により検討した。その結果、TaqMan PCRによって高発現量を検出した（ca. 1000-7000 copies/ng total RNA）細胞株3クローン（cl. 4、cl. 17、cl. 19）に
25 ついて、それぞれ最終濃度10⁻⁶ Mのメタスチンまたは10⁻⁸ Mのメタスチン（45-54）に応答することを確認した。

以降の転移実験ではcl. 4（B16-BL6/h175）を用いることにした。

(2) hOT7T175発現B16マウスメラノーマ細胞（B16-BL6/h175）を用いた自然転移モ

デルでのメタスチンの癌転移抑制作用の検討

メタスチンの癌転移抑制作用について、まず自然転移モデルを用いて検討した。

- 上記 (1) で作製したB16-BL6/h175細胞および空のベクターのみを発現させたB16-BL6/mock細胞を、 3×10^5 cells/ $20 \mu\text{l}$ /mouseの割合で、C57BL/6 (6週齢、雌、日本チャールズリバー) マウスの右前足 (forefoot pad) に皮下投与した。細胞投与18日後にケタミン麻酔下で蒸留水 (大塚蒸留水) に溶解した1 mMのメタスチン、およびvehicleとしての蒸留水を $100 \mu\text{l}$ づつ充填したAlzet浸透圧ポンプ (0.25 μl /hour, 14 days release, Model 1002, Alza社) をマウス背部の皮下に埋め込み、メタスチンの持続投与を開始した。細胞投与21日後に、エーテル麻酔下でマウスに形成した腫瘍を切除し、傷口をイソジン液で消毒後縫合した。細胞投与35日後に、マウスの腹部大動脈より脱血して肺を摘出した。摘出した肺は、1.4%ピクリン酸1水和物、4.8%中性ホルマリンおよび4.4%酢酸水溶液 (Bouin液) 中にて4℃、16時間固定後、肺に形成した癌転移結節数を実態顕微鏡下で計数した。結果を表1に示す。

15

細胞および投与法	投与群	腫瘍サイズ (mm ³) *	転移数 (個)	n
B16-BL6/h175 (皮下投与)	メタスチン	900.8 ± 97.6	13.0 ± 3.2** *	5
	対照群 (Vehicle群)	1037.2 ± 170.5* *	37.8 ± 2.5	4
B16-BL6/mock (皮下投与)	メタスチン	1062.9 ± 81.7**	31.2 ± 6.6**	10
	対照群 (Vehicle群)	1135.2 ± 99.6	26.4 ± 6.8	8

* : 21日目の腫瘍サイズ

** : Vehicle群に比して有意差なし

*** : 危険率1%以下 (Vehicle群比 ; Student's t検定) , 平均値 ± 標準誤差

20

メタスチン投与群では、vehicle投与群に比較して有意な肺への転移結節数の低下が認められた。

産業上の利用可能性

- メタスチンもしくはその誘導体またはその塩は、徐放性製剤化することによって、より有効に薬理効果を発揮する。メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を
- 5 含有する本発明の徐放性製剤は、メタスチンの生理活性障害を原因とする全ての疾患の治療または予防に有用である。特に本発明の製剤は、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌の治療または予防に有用である。また、本発明の製剤は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の治療または予防に有用である。更に、
- 10 本発明の製剤は、膵臓機能調節作用を有するため、膵臓疾患の治療または予防にも有用である。

請求の範囲

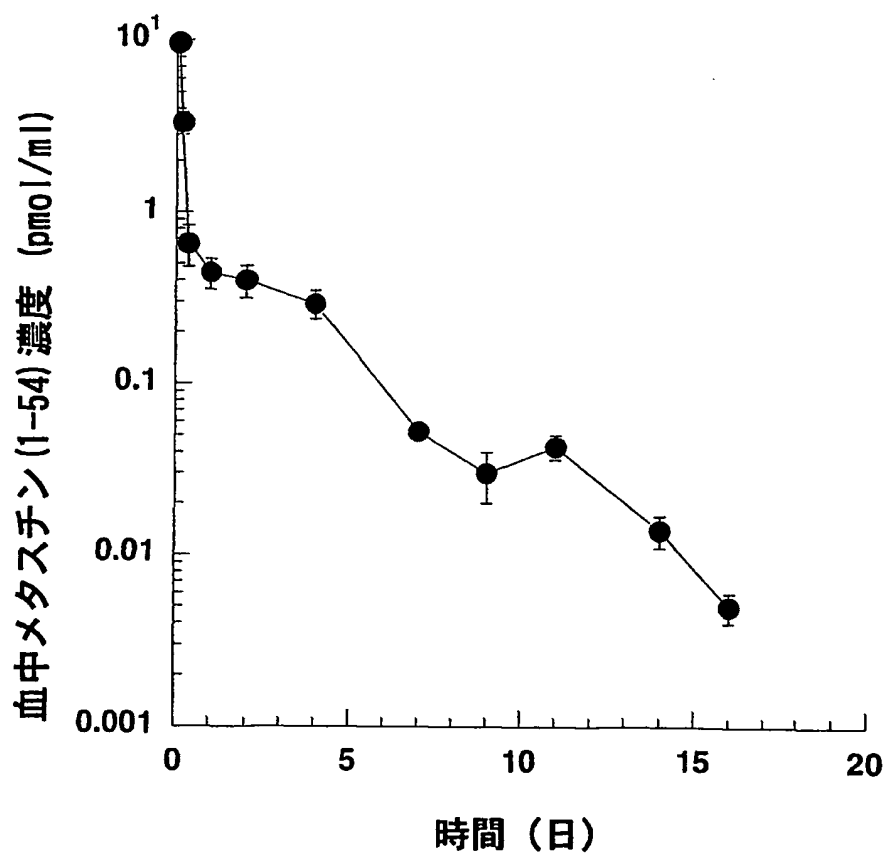
1. メタスチンもしくはその誘導体またはその塩を含有する徐放性製剤。
2. メタスチンを含有する請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 5 3. メタスチンまたはその誘導体が、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の N 末端から 47 ないし 54 番目のアミノ酸配列を含有し、かつ 8 ないし 54 個のアミノ酸残基からなるペプチドもしくはその誘導体である請求項 1 記載の徐放性製剤。
4. ペプチドが、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列における N 末端から 47 ないし 54 番目のアミノ酸配列を C 末端に有するペプチドである請求項 3 記載の
- 10 徐放性製剤。
5. ペプチドが、8 ないし 15 個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求項 3 または 4 記載の徐放性製剤。
6. ペプチドが、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 または配列番号：5 で表わされるアミノ酸配列からなるペプチドである請求項 3 記載の徐放性製剤。
- 15 7. メタスチンもしくはその誘導体またはその塩及びキャリアーを含有する請求項 1 記載の徐放性製剤。
8. キャリアーがポリマーである請求項 7 記載の徐放性製剤。
9. ポリマーが生体内分解性ポリマーである請求項 8 記載の徐放性製剤。
10. 生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである請求項 9 記載の徐放性製
- 20 剤。
11. 脂肪族ポリエステルが乳酸／グリコール酸重合体である請求項 10 記載の徐放性製剤。
12. 乳酸／グリコール酸重合体の乳酸／グリコール酸組成比が約 100／0 ないし約 40／60 である請求項 11 記載の徐放性製剤。
- 25 13. 乳酸／グリコール酸重合体の重量平均分子量が約 3,000 ないし約 80,000 である請求項 11 記載の徐放性製剤。
14. ポリマーが生体内非分解性ポリマーである請求項 8 記載の徐放性製剤。
15. 生体内非分解性ポリマーがポリグリセリン脂肪酸エステルである請求項 14

記載の徐放性製剤。

- 1 6. 癌の治療又は予防剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 1 7. 胎盤機能改善剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 1 8. 非経口投与剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 5 1 9. 皮下投与剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 2 0. 筋肉内投与剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 2 1. 腹腔内投与剤である請求項 1 記載の徐放性製剤。
- 2 2. 徐放性製剤を製造するためのメタスチンもしくはその誘導体またはその塩の使用。
- 10 2 3. 哺乳動物に対して請求項 1 記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする癌の治療又は予防方法

1/1

図 1



1/4
[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Peptide-containing Pharmaceutical Composition

<130> P02-0052PCT

<150> JP 2001-123299

<151> 2001-04-20

<160> 10

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50

<210> 2

2/4

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

10

15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

3/4

<213> Human

<400> 5

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1

5

<210> 6

<211> 162

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

gggacctgc gtgtcccgcc ccccgagagc tccgggagcc gccagcagcc gggcctgtcc 60
ggccccaca gccgccagat ccccgaccc cagggcgagg gtgtgggtga gcgggagaag 120
gacctgccga actacaactg gaactccttc ggcttgcgt tc 162

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

aaggacctgc cgaactacaa ctggaactcc ttgggcctgc gcttc 45

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

4/4

<400> 8

tacaactgga actccttcgg cctgcgcttc

30

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

aacttggaact ccctcggcct gcgcttc

27

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

tggaactcct tcggcctgcg cttc

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P35/00, 15/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P35/00, 15/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	OHTAKI T. et al., Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, NATURE, 2001, Vol.411, No.6837, pages 613 to 617	1-22
Y	LEE J.H. et al., KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, Journal of the National Cancer Institute, 1996, Vol.88, No.23, pages 1731 to 1737	1-22
Y	WO 00/078340 A1 (Riken Corp.), 28 December, 2000 (28.12.00), Full text & JP 2001-58955 A	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 July, 2002 (10.07.02)	Date of mailing of the international search report 23 July, 2002 (23.07.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03898

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/048519 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 September, 1999 (30.09.99), Full text & JP 11-322631 A	1-22
Y	WO 98/043664 A1 (LG Chemical Ltd.), 08 October, 1998 (08.10.98), Full text & JP 11-513047 A	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03898

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 23 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P35/00, 15/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00, 45/00, A61P35/00, 15/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992

日本国公開実用新案公報 1971-1992

日本国登録実用新案公報 1994-1996

日本国実用新案登録公報 1996-2002

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PY	OHTAKI T. et al, Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, NATURE, 2001, Vol.411, No.6837, pages 613-617	1-22
Y	LEE J. H. et al, KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1996, Vol.88, No.23, pages 1731-1737	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.07.02

国際調査報告の発送日

23.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岩下 直人

4C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 6612

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/078340 A1 (Riken Corp.) 2000. 12. 28 全文 & JP 2001-58955 A	1-22
Y	WO 99/048519 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 1999. 09. 30 全文 & JP 11-322631 A	1-22
Y	WO 98/043664 A1 (LG Chemical Ltd.) 1998. 10. 08 全文 & JP 11-513047 A	1-22

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 23 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT 規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.